

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 07 DEC 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

103 48 550.3

Anmeldetag:

20. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber:Hexal Biotech ForschungsGmbH,
83607 Holzkirchen/DE**Bezeichnung:**Stabile wässrige G-CSF-haltige Zusammen-
setzungen**IPC:**

A 61 K 38/18

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Klostermeyer

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Stabile wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind wässrige Zusammensetzungen, die G-CSF enthalten, G-CSF-Lyophilisate oder -Pulver, sowie Arzneimittel-Kits, die diese Lyophilisate oder Pulver enthalten.

10

G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor; Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor) ist ein natürlich vorkommender Wachstumsfaktor, der zur Familie der Zytokine gehört. G-CSF spielt eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese und fördert Reifung, Proliferation, Differenzierung und Überleben von Neutrophilen und neutrophilen Nachkommenzellen. G-CSF wird klinisch hauptsächlich bei der Tumorbekämpfung und insbesondere zur Behandlung von Neutropenie als Folge von Chemotherapie eingesetzt und findet ferner auch bei Knochenmarkstransplantationen und bei der Behandlung von Infektionskrankheiten Verwendung.

20

Humanes G-CSF in seiner natürlich vorkommenden Form ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 20 000 und weist fünf Cystein-Reste auf. Vier dieser Reste bilden zwei intramolekulare Disulfidbrücken, die für die Aktivität des Proteins von wesentlicher Bedeutung sind. Da G-CSF aus seinen natürlichen Quellen nur in geringen Mengen erhältlich ist, werden zur Herstellung von Arzneimitteln hauptsächlich rekombinante Formen von G-CSF verwendet, die beispielsweise durch Expression in Säugerzellen wie CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen oder Prokaryontenzellen wie E. Coli erhalten werden können. Die in Säugerzellen exprimierten rekombinanten Proteine unterscheiden sich von natürlich vorkommendem G-CSF durch das unterschiedliche Glykosylierungsmuster, während bei den in E. Coli exprimierten Proteinen, die als Folge der bakteriellen Expression einen

30

zusätzlichen N-terminalen Methioninrest aufweisen, die Glykosylierung vollständig fehlt.

Formulierungen von G-CSF sind aufgrund der hohen Hydrophobizität des Proteins relativ instabil, was besonders für die nicht-glykosylierten rekombinanten Formen des Proteins gilt. Da das Molekül leicht an die Wand von Ampullen, Spritzen o.ä. adsorbiert, Dimere oder höhere Aggregate bildet und chemischen Veränderungen wie Deamidierung, Oxidation, Spaltung von Disulfidbrücken oder Proteolyse unterliegt, kommt es so insbesondere bei längerer Lagerung des Proteins häufig zu Aktivitätsverlusten. Dies ist einerseits aus Kostengründen und andererseits aus therapeutischen Gründen nachteilig, beispielsweise wenn das G-CSF über einen längeren Zeitraum in konstanter Dosierung eingesetzt werden soll. Ferner können die beispielsweise durch Dimerisierung, Oxidation oder Abbau entstandenen Produkte zu möglicherweise unerwünschten Immunreaktionen führen.

Die DE-A-37 23 781 beschreibt Arzneimittel mit G-CSF als Wirkstoff, die zur Stabilisierung des Wirkstoffs mindestens ein pharmazeutisch verträgliches grenzflächenaktives Mittel, Saccharid, Protein oder eine pharmazeutisch verträgliche hochmolekulare Verbindung enthalten. Als besonders vorteilhafte grenzflächenaktive Mittel werden Polyoxyethylensorbitanester von aliphatischen Fettsäuren, beispielsweise das Monooleat oder das Monolaureat, vorgeschlagen, die zusammen mit Humanserumalbumin und Mannit eingesetzt werden. Die grenzflächenaktiven Mittel werden bevorzugt in einer Menge von 1 bis 10000 Gewichtsteilen pro Gewichtsteil G-CSF eingesetzt. Die wässrigen phosphatgepufferten Formulierungen, für die ein pH-Wert von 7,4 angegeben wird, sind bei 4°C über längere Zeit stabil.

Die beschriebenen pharmazeutischen Formulierungen haben jedoch einige Nachteile. So ist die Anwesenheit von Tensiden wie Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween® 80) besonders bei höheren Konzentrationen medizinisch nicht unbedenklich, da es bei der Verabreichung des Arzneimittels zu lokalen

Irritationen kommen kann. Ferner wurde beschrieben, dass solche Tenside in den beschriebenen Phosphatpuffern bei höheren Temperaturen wegen der besseren Zugänglichkeit des freien Cysteinrestes von G-CSF die unerwünschte Bildung von Dimeren und Multimeren fördern, so daß die Aktivität von G-CSF bei höheren Temperaturen sehr schnell abnimmt. Die zusätzlich in großen Mengen als Stabilisatoren eingesetzten Proteine und Peptide menschlichen und tierischen Ursprungs bergen ebenfalls ein Risikopotential, da sie wegen ihrer antigenen Eigenschaften immunologische Reaktionen beim Menschen hervorrufen können und auch virale Verunreinigungen nicht vollständig auszuschließen sind.

Die EP-A-0 373 679 offenbart, dass G-CSF über längere Zeit stabil gehalten werden kann, wenn es in Lösungen mit einem pH-Wert von 2,75 bis 4,0 formuliert wird, die vorteilhaft eine möglichst geringe Leitfähigkeit aufweisen. Um die Aggregation von G-CSF zu vermeiden, wird in diesen Formulierungen bevorzugt kein Puffer verwendet, in geringen Mengen von weniger als 2mM können jedoch Carbonsäuren, Citronensäure, Milchsäure oder Weinsäure als Puffersubstanzen eingesetzt werden. Stabile Formulierungen mit pH-Werten nahe dem physiologischen pH-Wert sind jedoch unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Herman, A.C. et al. ("Characterisation, Formulation, and Stability of Neupogen® (Filgrastim), a Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor." In: Formulation Characterisation and Stability of Protein Drugs, S. 303-328, R. Pearlman und Y.J. Wang, Hrsg., Plenum Press, New York, 1996) beschreiben stabilisierte Zusammensetzungen von nichtglykosyliertem rekombinantem G-CSF, die 10 mM Natriumacetat, pH 4,0, 5% Mannit und 0,004% Polysorbat-80 enthalten. Derartige Zusammensetzungen sind bei 2-8°C mehr als 24 Monate stabil. Stabile Zusammensetzungen mit höheren pH-Werten sind jedoch mit diesem System nicht möglich.

Die WO-A-94/14466 offenbart G-CSF-haltige wässrige pharmazeutische Zubereitungen, die Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure, Arginin und Salze davon als Puffersubstanzen enthalten können und pH-Werte zwischen 2,5 und 5,0 und zwischen 7 und 8 aufweisen.

5 Durch diese Zubereitungen wird die Bildung von Multimeren und Aggregaten von G-CSF bei mechanischen Belastungen, wie sie beispielsweise beim Schütteln von Lösungen auftreten, reduziert. Insbesondere bei höheren Temperaturen nimmt die Aktivität von G-CSF in diesen Zubereitungen jedoch rasch ab und die Langzeitstabilität ist nicht zufrieden stellend.

10

Die EP-A-0 306 824 beschreibt stabilisierte Präparate von Humanproteinen, insbesondere Erythropoietin, bei denen die Stabilisierung durch Zugabe von Harnstoff, Aminosäuren und Detergens erfolgt. In den für Injektionslösungen verwendeten Puffern, beispielsweise Phosphatpuffern, ist G-CSF bei höheren

15 Temperaturen jedoch nicht stabil genug.

Die WO-A-94/14465 offenbart lyophilisierte pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF, die Maltose, Saccharose, Raffinose, Trehalose oder Aminozucker enthalten. Die wässrigen Lösungen dieser Lyophilisate sind jedoch über längere

20

Die EP-A-1 197 221 offenbart langzeitstabile G-CSF-Formulierungen mit pH-Werten zwischen 5 und 7, die ein oder mehrere Aminosäuren aus der Gruppe Lysin, Histidin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin und

25 Asparagin sowie ein oder mehrerer hydrophobe Aminosäuren enthalten. Zur Vermeidung der Oxidation von Methioninresten im G-CSF-Molekül wird der Formulierung die Aminosäure Methionin zugesetzt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, wässrige G-CSF-haltige

30 Zusammensetzungen bereitzustellen, die auch in Abwesenheit von Serumproteinen über einen breiten pH-Bereich und bei höheren Temperaturen

über einen längeren Zeitraum stabil sind und sich insbesondere zur pharmazeutischen Anwendung eignen.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen, die Succinat und/oder Tartrat als Puffersubstanzen enthalten, auch bei höheren Temperaturen über einen breiten pH-Bereich und sogar bei pH-Werten, die nahe den physiologischen Bedingungen liegen, über ~~einen~~ lange Zeit stabil sind, da in solchen Zusammensetzungen kaum chemische Veränderungen wie Dimerisierung oder Oxidation des G-CSF-Moleküls auftreten. Daher geht auch bei längerer Lagerung kaum Aktivität verloren. Auch bei der Rekonstitution oder dem Auflösen von G-CSF-haltigen Lyophilisaten oder Pulvern und beim Filtrieren G-CSF haltiger Zusammensetzungen, dem Abfüllen in Ampullen oder dem Aufziehen in Spritzen verhindert die Anwesenheit von Succinat und/oder Tartrat unerwünschte Nebenreaktionen des G-CSF-Proteins.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen, welche als Puffersubstanzen Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfassen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Lyophilisate und Pulver, die G-CSF sowie Succinat und/oder Tartrat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon umfassen, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel-Kits, die räumlich voneinander getrennt a) ein G-CSF-haltiges Lyophilisat oder Pulver; und b) ein wässriges Lösungsmittel, welches Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, enthält, umfasst.

Weitere Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Ansprüchen und der nachfolgenden Beschreibung.

5 Fig. 1 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 20 mM Succinatpuffer bei pH-Werten zwischen 4,5 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0, bestimmt durch RP-HPLC und ausgedrückt als % Peakfläche (PA) der Anfangskonzentration (100 %) an Tag 0.

10 Fig. 2 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 10 mM Succinatpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

15 Fig. 3 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 5 mM Succinatpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

20 Fig. 4 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 20 mM Tartratpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

25 Fig. 5 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 10 mM Tartratpuffer bei pH-Werten zwischen 4,5 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

Fig. 6 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 5 mM Tartratpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

30 Fig. 7 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 13 und 20 Tagen Inkubation bei 37°C in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 4,5, 5,0 und 7,5.

Fig. 8 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF nach 30 und 90 Tagen Inkubation bei 37°C in 10 mM Succinat- oder Tartratpuffer bei pH 5,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

5 Das G-CSF-Protein in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann jedes beliebige G-CSF-Protein von Säugern, insbesondere Menschen, oder eine davon abgeleitete Variante sein, sofern diese Variante im Wesentlichen die für humanen G-CSF charakteristische biologische Aktivität bei der Hämatopoese besitzt. Der Begriff G-CSF, wie er hier verwendet wird, umfasst

10 demnach sowohl G-CSF natürlicher Herkunft als auch synthetisch oder rekombinant hergestellten G-CSF sowie Varianten davon, beispielsweise rekombinante humane Proteine mit einem N-terminalen Methioninrest, wie sie bei der Expression des G-CSF-Gens in Prokaryonten erhalten werden, Fusionsproteine von G-CSF, sowie G-CSF-Proteine, wie sie die durch

15 Austausch, Deletion oder Insertion von ein oder mehreren Aminosäuren des natürlich vorkommenden G-CSF erhalten werden. G-CSF kann glykosyliert oder nicht-glykosyliert sein. Nicht-glykosylierter G-CSF wird beispielsweise bei der Expression in Prokaryontenzellen wie E. Coli erhalten, während glykosylierter G-CSF entweder bei der Isolierung aus natürlichen Quellen, bei der Expression,

20 in Eukaryontenzellen wie CHO-Zellen oder durch synthetische Glykosylierung erhalten werden kann. Synthetisch modifizierter G-CSF kann beispielsweise durch enzymatische Glykosylierung oder auch durch chemische PEGylierung erhalten werden. G-CSF-Varianten, wie sie in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verwendet werden können, sind beispielsweise in der

25 EP-A-0 456 200 beschrieben. Bevorzugt wird rekombinanter, nicht-glykosylierter G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verwendet, besonders bevorzugt umfaßt der G-CSF die Aminosäuresequenz von humanem G-CSF, wie sie beispielsweise in der DE-A-37 23 781 angegeben ist, oder eine davon abgeleitete Sequenz.

30

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen wässrigen Zusammensetzungen, der Lyophilisate und der Pulver können die Puffersubstanzen Succinat und Tartrat

sowohl in Form der freien Säure als auch in Form der Salze eingesetzt werden. Als Salze der Bernsteinsäure und der Weinsäure werden insbesondere die physiologisch verträglichen Salze eingesetzt, beispielsweise Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze. Bevorzugt sind die Alkali- und Ammoniumsalze, besonders bevorzugt die Di-Natrium-Salze. Falls gewünscht kann die erfindungsgemäße wässrige Zusammensetzung neben Succinat und Tartrat auch noch andere Puffersubstanzen enthalten, dies ist jedoch nicht erforderlich.

Die Konzentrationen der Puffersubstanzen Succinat und Tartrat werden vorteilhaft so gewählt, dass bei dem gewünschten pH-Wert sowohl die pH-stabilisierende Wirkung als auch eine ausreichende Pufferkapazität erzielt werden, gleichzeitig aber die Ionenkonzentration und damit die Leitfähigkeit möglichst gering gehalten wird, um Aggregatbildungen zu vermeiden. In der Regel liegen die Konzentrationen, in denen die Puffersubstanzen in der wässrigen Zusammensetzung eingesetzt werden, zwischen 0,5 und 150 mM, vorzugsweise zwischen 1 und 100 mM und ganz besonders bevorzugt zwischen 1 und 50 mM, beispielsweise zwischen 2 und 20 mM. Falls Succinat und Tartrat gemeinsam eingesetzt werden, liegt die Gesamtkonzentration dieser Puffersubstanzen vorteilhaft innerhalb dieser Bereiche.

Der pH-Wert der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen liegt üblicherweise zwischen 3,5 und 6,0, beispielsweise zwischen 4,0 und 5,9. Vorzugsweise ist der pH größer 4,0 und liegt beispielsweise zwischen 4,1 und 5,7, insbesondere zwischen 4,5 und 5,5. Falls gewünscht kann der pH-Wert auch noch mit Hilfe anderer Säuren oder Basen auf den gewünschten Wert eingestellt werden. Geeignete Säuren sind beispielsweise Salzsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Citronensäure und Natrium- oder Kaliumdihydrogenphosphat. Geeignete Basen sind beispielsweise Alkali- und Erdalkalihydroxide, Alkalicarbonate, Alkaliacetate, Alkalicitrate und Di-Alkalihydrogenphosphate, beispielsweise Natriumhydroxid, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumcitrat, Di-Natrium- und Di-Kaliumhydrogenphosphat sowie Ammoniak.

Die Konzentration von G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen ist im Wesentlichen abhängig vom Verwendungszweck. Die obere Grenzkonzentration ergibt sich aus der Löslichkeit von G-CSF im Puffer. In pharmazeutischen Zusammensetzungen liegt G-CSF in einer pharmazeutisch wirksamen Menge vor, wobei die Konzentration gewöhnlich nicht mehr als 5mg/ml beträgt und beispielsweise zwischen 0,0001 und 5 mg/ml, vorzugsweise zwischen 0,0005 und 4 mg/ml und besonders bevorzugt zwischen 0,001 und 2,5 mg/ml, beispielsweise zwischen 0,01 und 1,5 mg/ml, liegt.

10

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können weitere übliche, insbesondere physiologisch verträgliche Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe enthalten, beispielsweise Tenside, isotonisierende Mittel, Aminosäuren, Reduktionsmittel, Antioxidantien, Komplexbildner, Cosolventien, Verdünnungsmittel und chaotrope Agenzien.

15

Bevorzugt enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung ein oder mehrere Tenside, beispielsweise nichtionische Tenside, wie sie in der EP-A-1 197 221 beschrieben sind, insbesondere Polyoxyethylensorbitanester aliphatischer Fettsäuren. Hier sind beispielsweise Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (erhältlich unter dem Handelsnamen Polysorbat 20), Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat (Polysorbat 40), Polyoxyethylensorbitanmonostearat (Polysorbat 60), Polyoxyethylensorbitantristearat (Polysorbat 65), Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Polysorbat 80) und Polyoxyethylensorbitantrioleat (Polysorbat 85) zu nennen, wobei Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat und Polyoxyethylensorbitanmonooleat bevorzugt sind. Diese Tenside können, falls gewünscht, aufgrund des vorteilhaften stabilisierenden Puffersystems der Erfindung in sehr geringen Mengen eingesetzt werden, beispielsweise in Mengen von 0,0005 bis 0,04 % (w/v), vorzugsweise von 0,001 bis 0,02 % (w/v), bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung.

20

25

30

Vorteilhaft sind die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, insbesondere wenn sie für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden, mit dem Blut des Patienten isotonisch. Dies kann bereits durch die Wahl geeigneter Konzentrationen an Puffersubstanzen erfolgen. Zur Herstellung physiologisch gut verträglicher Zusammensetzungen können jedoch auch weitere isotonisierende Mittel, beispielsweise Zucker oder Zuckeralkohole, zugesetzt werden. Geeignete isotonisierende Mittel sind beispielsweise Saccharose, Maltose, Fruktose, Lactose, Mannit, Sorbit und Glycerin. Bevorzugt werden Mannit und Sorbit eingesetzt. Es können auch Salze zur Isotonisierung eingesetzt werden, diese werden jedoch üblicherweise nur in geringen Konzentrationen zugegeben, da zu hohe Ionenkonzentrationen die Aggregatbildung fördern. Isotonisierende Mittel werden zweckmäßig in Mengen von bis zu 10,0 % (w/v) zugesetzt, bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung. Bevorzugt werden Mengen von bis zu 7,5 %, besonders bevorzugt bis zu 6,0 %, beispielsweise zwischen 0,1 und 5,5 % (w/v) eingesetzt.

Als Aminosäuren können beispielsweise Glycin, Threonin, Tryptophan, Lysin, Hydroxylysin, Arginin, Histidin, Cystein, Ornithin, Phenylalanin, Methionin, Glutamin, Asparagin oder Salze davon eingesetzt werden. Aminosäuren oder Aminosäuresalze werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 100 mM, vorzugsweise von 1 bis 50 mM eingesetzt.

Als Reduktionsmittel sind insbesondere schwefelhaltige Reduktionsmittel geeignet, beispielsweise Thioglycerin, Glutathion, Dithioglycol, Thiodiglycol, N-Acetylcystein, Thiosorbit, Thioethanolamin, Natriumthiosulfat, Natriumhydrogensulfit, Natriumpyrosulfit, Dithiothreitol oder Thioalkansäuren mit insbesondere 1 bis 7 Kohlenstoffatomen. Reduktionsmittel werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 100 mM, vorzugsweise von 1 bis 50 mM eingesetzt.

Als Antioxidantien können beispielsweise Ascorbinsäure oder ihre Salze, Ascorbinsäurepalmitat, Ascorbinsäurestearat, Triamylgallat, α -Tocopherol, Tocopherolacetat und Butylhydroxyanisol verwendet werden. Antioxidantien werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 100 mM, vorzugsweise von 1 bis 50 mM eingesetzt.

Als Komplexbildner geeignet sind beispielsweise Citrat, Dinatriumethyldiamintetraacetat (EDTA), Natriumpyrophosphat oder Natriummetaphosphat. Bevorzugt wird Citrat, in Form der freien Säure oder eines Salzes davon, als Komplexbildner verwendet. Komplexbildner werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,01 bis 20 mM, vorzugsweise von 0,1 bis 10 mM und ganz besonders bevorzugt von 0,2 bis 5 mM eingesetzt.

Als chaotrope Agenzien können beispielsweise Harnstoff, Guanidinium-Hydrochlorid oder Guanidiniumisocyanat verwendet werden. Chaotrope Agenzien werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 50 mM, vorzugsweise von 1 bis 30 mM eingesetzt.

Falls gewünscht, können die erfindungsgemäßen G-CSF-haltigen Zusammensetzungen auch weitere Proteine wie Humanserumprotein enthalten. Bevorzugt sind aufgrund der mit Fremdproteinen verbundenen Risiken jedoch Zusammensetzungen, die frei von weiteren Proteinen sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Üblicherweise werden die Puffersubstanzen und, gegebenenfalls, die weiteren Stabilisierungsmittel und/oder die Hilfs- und Zusatzstoffe zunächst in den geeigneten Mengen in dem wässrigen Lösungsmittel, gewöhnlich sterilem Wasser, gelöst. Falls erforderlich wird der pH-Wert mit Succinat und/oder Tartratlösung oder mit anderen Säuren oder Basen, wie den oben beispielhaft genannten, eingestellt. Nach einem üblichen Sterilisierungsschritt, beispielsweise Filtration durch ein Sterilfilter, wird G-CSF in den gewünschten Konzentrationen zugegeben.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen finden insbesondere als pharmazeutische Zusammensetzungen Verwendung, wobei die gegebenenfalls vorhandenen Stabilisierungsmittel und die Hilfs- und Zusatzstoffe physiologisch
5 verträglich sein müssen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in den verschiedenartigsten Applikationsformen eingesetzt werden. Beispielsweise können die Zusammensetzungen als Injektions- oder Infusionslösungen, insbesondere zur intravenösen, intramuskulären oder subkutanen Verabreichung, oder als Zusammensetzungen zur oralen
10 Verabreichung vorliegen. Die Zusammensetzungen können jedoch auch zur Herstellung weiterer pharmazeutischer Applikationsformen verwendet werden, beispielsweise von Hydrogelen oder Liposomen. Solche pharmazeutischen Zubereitungen können auf sämtlichen Indikationsgebieten eingesetzt werden, auf denen G-CSF zur Anwendung kommen kann, beispielsweise zur
15 Behandlung von Neutropenie, bei Knochenmarkstransplantationen und bei der Behandlung von Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner G-CSF-haltige Lyophilisate und Pulver, die Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder
20 eines Salzes davon, umfassen. Solche Lyophilisate und Pulver lassen sich beispielsweise in an sich bekannter und einfacher Weise durch Lyophilisieren oder z.B. durch Sprühtrocknung aus den zuvor beschriebenen wässrigen Zusammensetzungen erhalten. In diesen Lyophilisaten und Pulvern liegen G-CSF, Succinat und/oder Tartrat sowie gegebenenfalls weitere
25 Puffersubstanzen, Stabilisierungsmittel und Hilfs- und Zusatzstoffe in solchen Mengen vor, dass nach erneutem Auflösen in Wasser G-CSF-haltige Zusammensetzungen erhalten werden, die wie die entsprechenden wässrigen Zusammensetzungen auch bei höheren Temperaturen über einen längeren Zeitraum stabil sind.

30

Die erfindungsgemäßen Lyophilisate oder Pulver können beispielsweise in Form eines Arzneimittel-Kits bereitgestellt werden, in dem Lyophilisat oder

Pulver räumlich getrennt von einer geeigneten Menge eines wässrigen Lösungsmittels vorliegen. Die stabile gepufferte wässrige Zusammensetzung kann dann zu jedem gewünschten Zeitpunkt, beispielsweise vom medizinischen Personal, hergestellt werden.

5

Alternativ können die zur Herstellung der stabilen wässrigen Zusammensetzungen erforderlichen Puffersubstanzen und gegebenenfalls die weiteren Stabilisierungsmittel und die Hilfs- und Zusatzstoffe nur im wässrigen Lösungsmittel vorliegen, während Lyophilisat oder Pulver lediglich G-CSF enthalten, oder Puffersubstanzen, Stabilisierungsmittel und Hilfs- und Zusatzstoffe können sowohl im Lyophilisat oder Pulver als auch im wässrigen Lösungsmittel vorliegen.

10

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der folgenden Beispiele näher erläutert, ohne dass in diesen Beispielen eine Beschränkung zu sehen ist.

15

Beispiele

20

1. Herstellung G-CSF-haltiger Zusammensetzungen

25

Alle G-CSF-haltigen Zusammensetzungen wurden hergestellt, indem die Puffersubstanzen Succinat und Tartrat in Form der Dinatriumsalze zusammen mit Polysorbat-80 und Mannit zunächst in destilliertem und sterilem Wasser gelöst wurden und anschließend der pH-Wert mit Succinat- oder Tartratpuffer auf den gewünschten Wert eingestellt wurde. Im Handel erhältlicher nicht-glykosylierter rekombinanter humaner G-CSF wurde nach Filtration durch ein Sterilfilter (Porengröße $0,2 \mu\text{m}$, Millipore®) zugegeben.

30

Die hergestellten Zusammensetzungen wurden anschließend bei $4 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ und $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 8 Wochen lang inkubiert. Als Vergleich dienten eine herkömmliche G-CSF-haltige Formulierung mit $0,3 \text{ mg/ml}$ G-CSF in 10 mM

Natriumacetat, pH 4,0, 0,5% (w/v) Mannit und 0,004 % (w/v) Polysorbat-80, sowie eine Formulierung mit 0,3 mg/ml G-CSF in 10 mM Phosphat, pH 4,0, 5,00 und 7,50, mit 0,5% (w/v) Mannit und 0,004 % (w/v) Polysorbat-80.

- 5 Die genauen Formulierungen der hergestellten erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und deren pH-Werte sind in den nachfolgenden Tabellen 1 bis 6 angegeben.

Tabelle 1: G-CSF-haltige Formulierung mit 20 mM Succinatpuffer

	Formulierung								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Substanz									
G-CSF [mg/ml]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mannit [% w/v]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polysorbat-80 [% w/v]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Succinat- puffer [mM]	20	20	20	20	20	20	20	20	20
pH	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00

Tabelle 2: G-CSF-haltige Formulierung mit 10 mM Succinatpuffer

	Formulierung								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Substanz									
G-CSF [mg/ml]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mannit [% w/v]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polysorbat-80 [% w/v]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Succinat- puffer [mM]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
pH	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00

Tabelle 3: G-CSF-haltige Formulierung mit 5 mM Succinatpuffer

	Formulierung								
	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Substanz									
G-CSF [mg/ml]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mannit [% w/v]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polysorbat-80 [% w/v]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Succinat- puffer [mM]	5	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00

Tabelle 4: G-CSF-haltige Formulierung mit 20 mM Tartratpuffer

	Formulierung								
	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Substanz									
G-CSF [mg/ml]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mannit [% w/v]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polysorbat-80 [% w/v]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Tartratpuffer [mM]	20	20	20	20	20	20	20	20	20
pH	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00

Tabelle 5: G-CSF-haltige Formulierung mit 10 mM Tartratpuffer

	Formulierung								
	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Substanz									
G-CSF [mg/ml]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mannit [% w/v]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polysorbat-80 [% w/v]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Tartratpuffer [mM]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
pH	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00

Tabelle 6: G-CSF-haltige Formulierung mit 5 mM Tartratpuffer

	Formulierung								
	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Substanz									
G-CSF [mg/ml]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mannit [% w/v]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polysorbat-80 [% w/v]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Tartratpuffer [mM]	5	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	4,00	4,25	4,50	4,75	5,00	5,25	5,50	5,75	6,00

2. Analysemethoden

2.1 Bestimmung der G-CSF-Konzentration

- 5 Die Bestimmung der Konzentration von chemisch unmodifiziertem monomeren G-CSF erfolgte mittels Reverse Phase-Hochleistungschromatographie (RP-HPLC) mit einer C4 Vydac-Säule. Die mobile Phase enthielt mit Trifluoressigsäure (TFA) angesäuertes Wasser als Eluens A und mit TFA angesäuertes Acetonitril als Eluens B. Die Chromatographie wurde 1 Stunde
10 bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mit einem isokratischen Gradienten von A und B durchgeführt. Das Einspritzvolumen betrug 5 µl. Die Detektionswellenlänge war 206 nm und die Auswertung erfolgte mit einer bekannten G-CSF-Verdünnung als externem Standard. Die Konzentration von G-CSF wurde entsprechend der Methode von Herman, A.C. (a.a.O.) als
15 % Peakfläche (PA) der Anfangskonzentration an Tag 0 bestimmt, die als 100 % definiert wurde.

2.2 Bestimmung der biologischen Aktivität von G-CSF

- 20 Zum Nachweis der Eignung der erfindungsgemäßen Puffersubstanzen zur Stabilisierung von G-CSF wurde ferner die biologische Aktivität von G-CSF nach Langzeitinkubation bestimmt. Eine im Wesentlichen gleich bleibende biologische Aktivität eines gegebenen G-CSF-Proteins nach längerer Lagerung, insbesondere bei erhöhter Temperatur, zeigt an, dass an dem Protein keine
25 oder nur geringe chemische Veränderungen erfolgt sind.

- Die biologische Aktivität von G-CSF wurde mittels eines NFS-60-Bioassays bestimmt (Tohyama, K. et al., Japanese J. Cancer Res. 80:335-340, 1989). Hierbei wurde die G-CSF-Aktivität festgestellt, indem die Induktion der
30 Zellproliferation als Reaktion auf verschiedene Konzentrationen von G-CSF gemessen wurde. Die Proliferation der NFS-60-Zellen wurde durch Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität verfolgt. Dehydrogenase reduziert

3-(4,5-Dimethylthiatholyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan, welches photometrisch bei einer Detektionswellenlänge von 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen werden kann. Die Dehydrogenase-Aktivität und damit die Menge gebildetes Formazan korrelieren direkt mit der Zellzahl der NFS-60-Zellen.

3. Ergebnisse

3.1 G-CSF-Konzentrationen in Formulierungen mit Succinatpuffer

10

Die Analyse der Zusammensetzungen 1 bis 27 (Tabelle 1-3; Fig. 1-3) mittels RP-HPLC nach 4 und 8 Wochen Inkubation zeigte, dass die Konzentration von G-CSF verglichen mit der Anfangskonzentration der Experimente auch noch nach 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 20, 10 und 5 mM Succinatpuffer sehr hoch war. Die Stabilität von G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen ist vergleichbar mit der Stabilität von G-CSF in einer herkömmlichen Formulierung mit 10 mM Acetat, pH 4,0, jedoch bei deutlich höheren pH-Werten. Die Figuren 1 bis 3 zeigen repräsentative Beispiele für Formulierungen mit Succinatpuffer bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich mit einer herkömmlichen Acetat-Formulierung bei pH 4,0. Figur 1 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 20 mM Succinatpuffer bei pH 4,5, 5,0 und 6,0. Figur 2 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 10 mM Succinatpuffer bei pH 4,0, 4,5, 5,0 und 6,0. Figur 3 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF zu Beginn des Experiments und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 5 mM Succinatpuffer bei pH 4,0, 4,5, 5,5 und 6,0.

20

25

3.2 G-CSF-Konzentrationen in Formulierungen mit Tartratpuffer

30

Die Analyse der Zusammensetzungen 28 bis 54 (Tabelle 4-6, Fig. 4-6) mittels RP-HPLC nach 4 und 8 Wochen Inkubation zeigte, dass die Konzentration von

G-CSF verglichen mit der Anfangskonzentration der Experimente auch noch nach 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 20, 10 und 5 mM Tartratpuffer sehr hoch war. Auch in diesem Fall ist die Stabilität von G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen vergleichbar mit der Stabilität von G-CSF in einer
5 herkömmlichen Formulierung mit 10 mM Acetat, pH 4,0. Die Figuren 4 bis 6 zeigen repräsentative Beispiele für Formulierungen mit Tartratpuffer bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich mit einer herkömmlichen Acetat-Formulierung bei pH 4,0. Figur 4 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 20
10 mM Tartratpuffer bei pH 4,0, 5,0, 5,5 und 6,0. Figur 5 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 10 mM Tartratpuffer bei pH 4,5, 5,5 und 6,0. Figur 6 zeigt die relativen Konzentrationen von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 5 mM Tartratpuffer bei pH 4,0,
15 4,5, 5,5 und 6,0.

3.3 Langzeitstabilität von G-CSF bei 37°C in verschiedenen Puffern

In einem weiteren Versuch wurde die Langzeitstabilität von G-CSF bei 37°C in
20 10 mM Succinat- und Tartratpuffer, pH 5,0 (Formulierungen 58 und 59); in 10 mM Acetatpuffer, pH 4,0 (Formulierung 60), sowie in 10 mM Phosphatpuffer, pH 4,5, 5,0 und 7,5 (Formulierungen 55-57), bestimmt (Tabelle 7). Die relativen Konzentrationen von G-CSF, die wie in den vorhergehenden Versuchen mittels RP-HPLC bestimmt wurden, sind in den Figuren 7 und 8 graphisch dargestellt.
25 Die Ergebnisse zeigen, dass die Konzentrationen von G-CSF in den Formulierungen mit Succinat- und Tartratpuffer auch noch nach 90 Tagen Inkubation mit den Konzentrationen vergleichbar sind, die in 10 mM Acetat, pH 4,0, beobachtet werden. Dagegen nimmt die G-CSF-Konzentration in den Formulierungen mit 10 mM Phosphatpuffer bei pH 5,0 bereits nach 13 Tagen
30 drastisch ab und ist nach 20 Tagen vernachlässigbar gering.

Tabelle 7: G-CSF-haltige Formulierung mit 10 mM Phosphat-, Succinat- und Tartratpuffer sowie mit 10 mM Essigsäure

	Formulierung					
	55	56	57	58	59	60
Substanz						
G-CSF [mg/ml]	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mannit [% w/v]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polysorbat-80 [% w/v]	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Inkubationsdauer [Tage]	20	20	20	90	90	90
Phosphatpuffer [mM]	10	10	10	-	-	-
Succinatpuffer [mM]	-	-	-	10	-	-
Tartratpuffer [mM]	-	-	-	-	10	-
Essigsäure [mM]	-	-	-	-	-	10
pH	4,5	5,0	7,5	5,0	5,0	4,0

3.4 Biologische Aktivität von G-CSF in Succinat- und Tartratpuffern

Die Analyse einiger repräsentativer Formulierungen (3, 4, 5, 13, 14, 23, 32 und 41 der Tabellen 1 bis 6), welche bei 25°C und 37°C eingelagert wurden, mit dem weiter oben unter 2.2 beschriebenen Bioassay zeigt, dass die biologische Aktivität von G-CSF-Formulierungen mit den erfindungsgemäßen Puffersubstanzen Succinat oder Tartrat bei verschiedenen Konzentrationen (5 bis 20 mM) und bei verschiedenen pH-Werten (pH 4,5 bis pH 5,5) auch unter Stressbedingungen von 25°C und 37°C und pH-Werten von 5,0 noch nach 90 Tagen Inkubation zwischen 80 und 120 % der anfänglichen Aktivität liegt (Tabelle 8).

Die oben beschriebenen Versuche zeigen, dass G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen auch bei pH-Werten, die nahe den physiologischen pH-Werten liegen, über lange Zeit und bei Temperaturen bis mindestens 37°C stabil sind. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eignen sich daher beispielsweise sehr gut für den Einsatz als Injektionslösungen, mit denen sich wegen des physiologischen pH-Werts Hautirritationen verhindert lassen. Die Anwesenheit von Succinat und/oder Tartrat verhindert ferner unerwünschte Reaktionen von G-CSF bei der Rekonstitution des Proteins, beispielsweise beim Auflösen, oder beim Filtrieren, Abfüllen in Ampullen oder Aufziehen in Spritzen.

Die Ergebnisse sind vergleichbar mit Formulierungen in 10 mM Acetat, pH 4,0 und deutlich besser als bei Formulierungen mit 10 mM Phosphatpuffer mit pH 5,0 und 7,5.

Patentansprüche

1. Wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzung, welche als Puffersubstanzen Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst,
5
ausgenommen Zusammensetzungen mit einer Tartratkonzentration von weniger als 2 mM und einem pH-Wert von $\leq 4,0$, die kein Succinat als Puffersubstanz enthalten.
10
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der pH-Wert der Zusammensetzung zwischen 3,5 und 6,0, bevorzugt zwischen 4,0 und 5,8, und besonders bevorzugt zwischen 4,5 und 5,5 liegt.
- 15 3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Salz der Bernsteinsäure und/oder der Weinsäure ausgewählt ist aus Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalzen.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das Salz der Bernsteinsäure und/oder der Weinsäure das Di-Natriumsalz ist.
20
5. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei Succinat und/oder Tartrat in einer Konzentration von 0,5 bis 150 mM, vorzugsweise von 1 bis 100 mM und besonders bevorzugt von 1 bis
25 50 mM vorliegen.
6. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei G-CSF in einer Konzentration von 0,0001 bis 5 mg/ml, insbesondere von 0,0005 bis 4 mg/ml und bevorzugt von 0,01 bis 1,5 mg/ml vorliegt.
30
7. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, welche ferner ein oder mehrere weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und

Zusatzstoffe umfasst, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden, isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.

5

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Tensid ein nichtionisches Tensid ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyoxyethylensorbitanmonolaureat, Polyoxyethylensorbitanmonooleat, Polyoxyethylensorbitanmonostearat, Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat, Polyoxyethylensorbitantrioleat und Polyoxyethylensorbitantristearat.

10

9. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei der Komplexbildner Citrat ist.

15

10. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das isotonisierende Mittel Mannit und/oder Sorbit ist.

20

11. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10 als pharmazeutisches Präparat.

12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das pharmazeutische Präparat eine Injektions- oder Infusionslösung ist.

25

13. Lyophilisat oder Pulver, umfassend G-CSF sowie Succinat und/oder Tartrat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon.

30

14. Lyophilisat oder Pulver nach Anspruch 13, wobei das Salz der Bernsteinsäure und/oder der Weinsäure ausgewählt ist aus Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalzen.

15. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 oder 14, wobei das Salz der Bernsteinsäure und/oder der Weinsäure das Di-Natriumsalz ist.
- 5 16. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 15, welches ferner ein oder mehrere weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe umfasst, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden, isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.
- 10 17. Lyophilisat oder Pulver nach Anspruch 16, wobei der Komplexbildner Citrat ist.
- 15 18. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 17, erhältlich durch Lyophilisieren bzw. Sprühtrocknen einer wässrigen G-CSF-haltigen Zusammensetzung, welche als Puffersubstanzen Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst.
- 20 19. Arzneimittel-Kit, umfassend räumlich voneinander getrennt:
- a) ein G-CSF-haltiges Lyophilisat oder Pulver; und
- 25 b) ein wässriges Lösungsmittel, welches Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst.
20. Arzneimittel-Kit, nach Anspruch 19, wobei das G-CSF-haltige Lyophilisat oder Pulver Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder
- 30 eines Salzes davon, umfasst.

21. Arzneimittel-Kit, nach Anspruch 19 oder 20, wobei das Lyophilisat oder
Pulver und/oder das wässrige Lösungsmittel ferner ein oder mehrere
weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe umfassen,
insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden,
isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln,
Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.
22. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach irgendeinem
der Ansprüche 1 bis 12, welches das Lösen von G-CSF in einem
wässrigen Lösungsmittel umfasst, welches Succinat und/oder Tartrat, in
Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, als
Puffersubstanzen umfasst.
23. Verfahren zur Herstellung eines Lyophilisats oder eines Pulvers nach
irgendeinem der Ansprüche 13 bis 18, welches das Lyophilisieren oder
die Sprühtrocknung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der
Ansprüche 1 bis 10 umfasst.
24. Verwendung von Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure
und/oder eines Salzes davon, zur Stabilisierung von G-CSF.
25. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche
1 bis 10 oder eines Lyophilisats oder Pulvers nach irgendeinem der
Ansprüche 13 bis 18 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.

Fig. 1

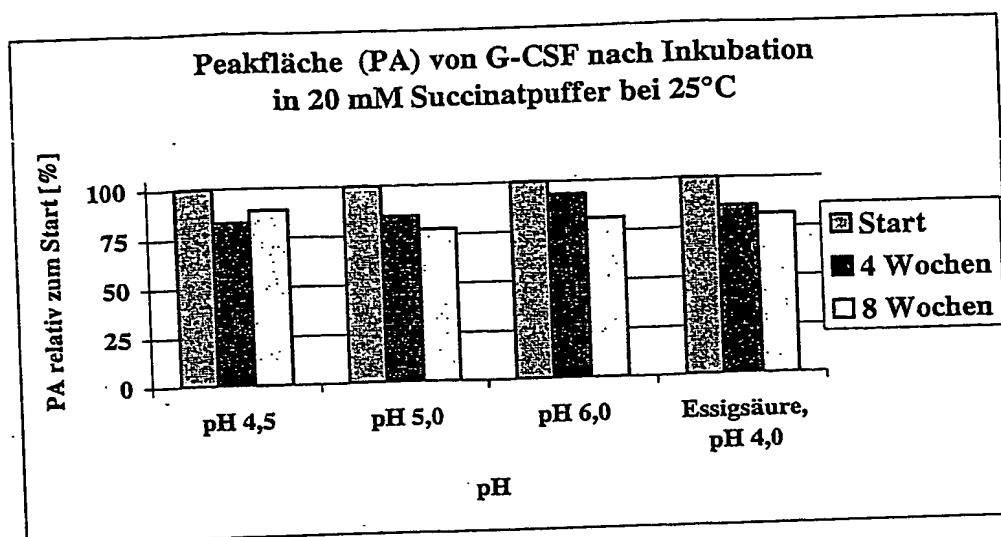


Fig. 2

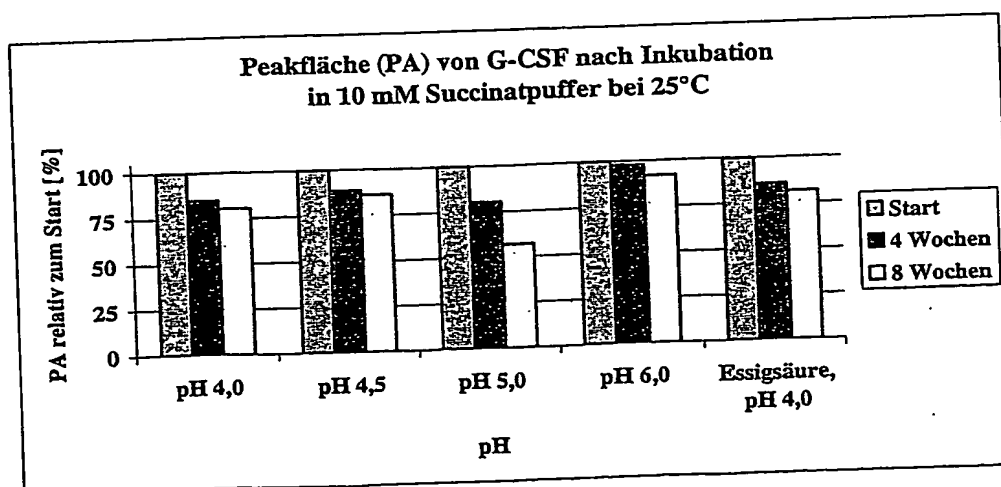


Fig. 3

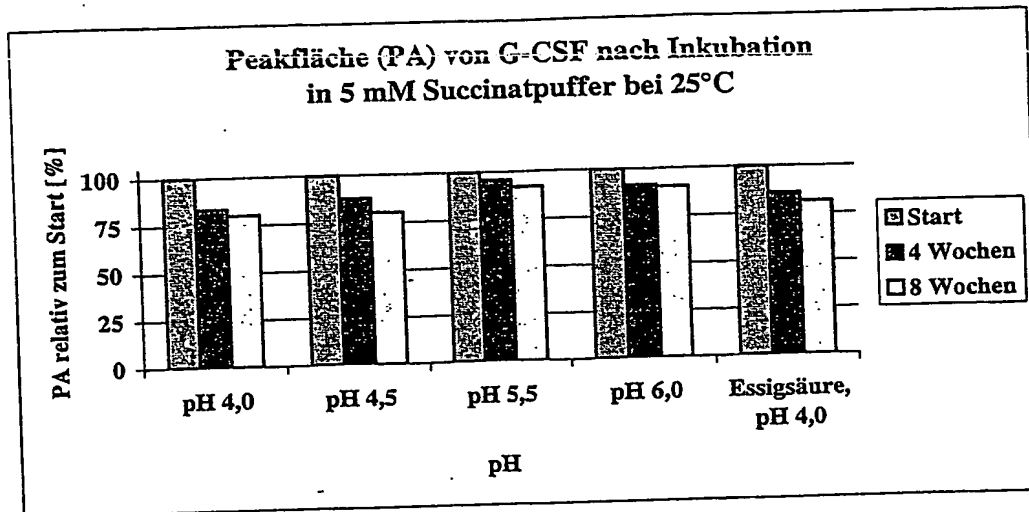


Fig. 4

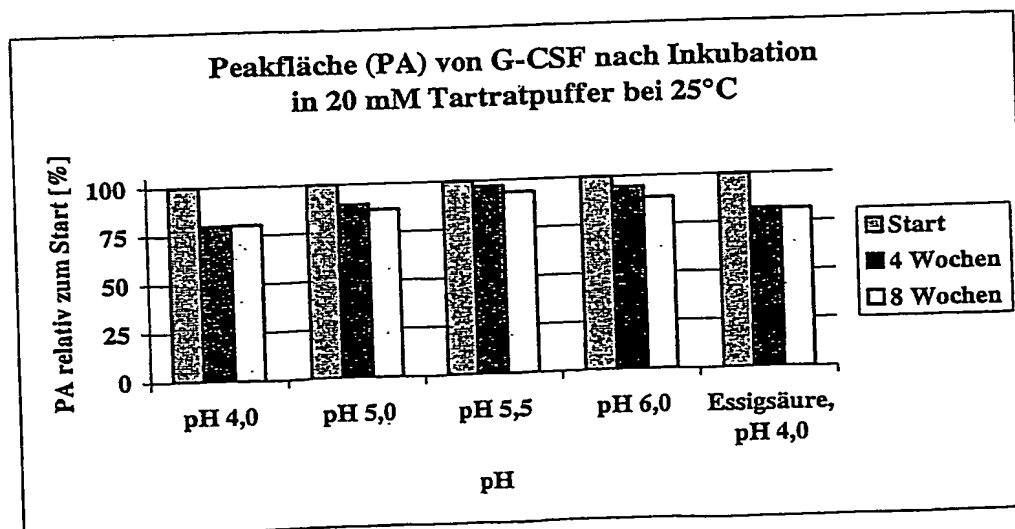


Fig. 5

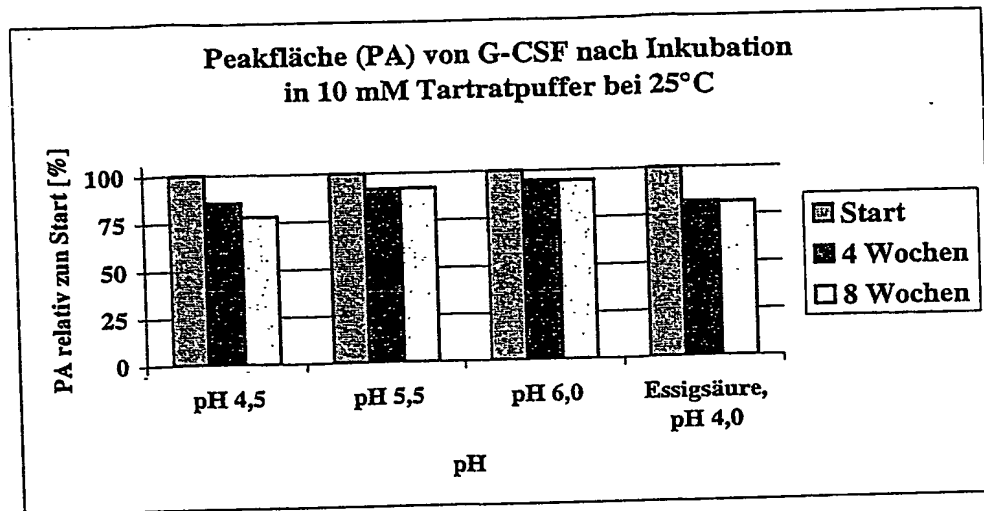


Fig. 6

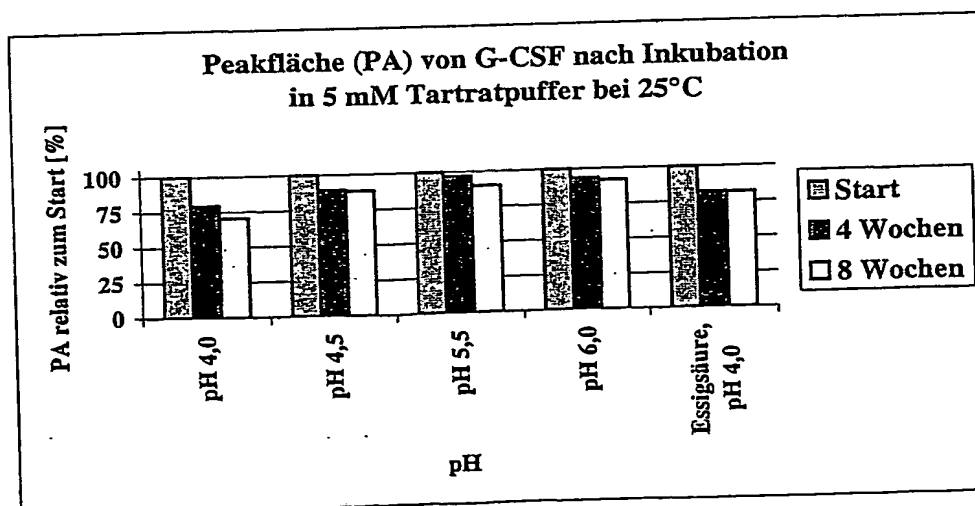


Fig. 7

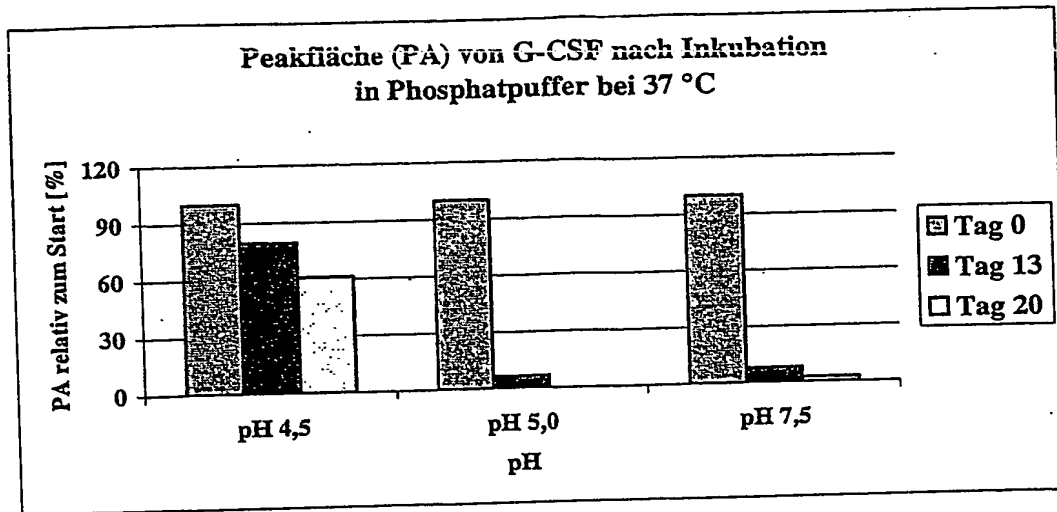
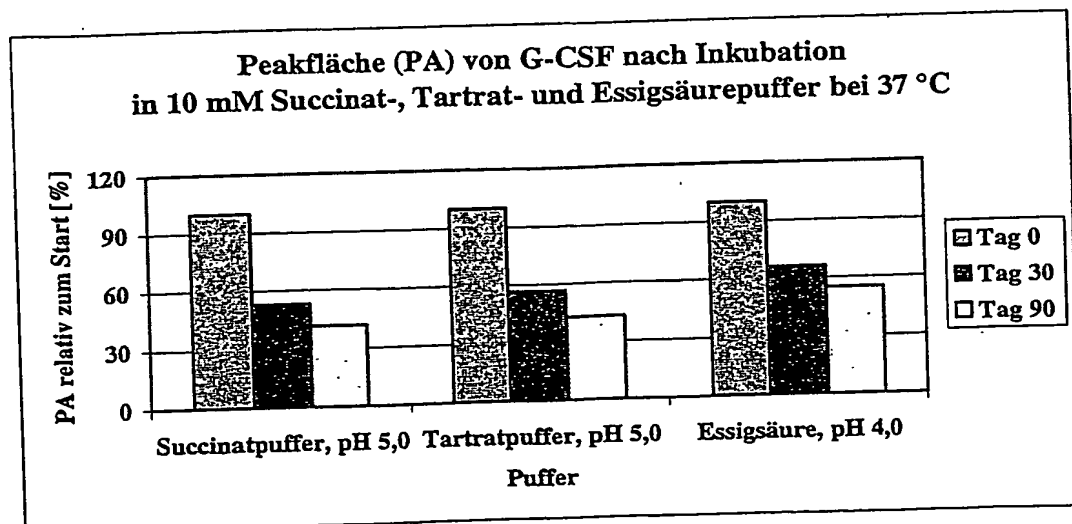


Fig. 8



Zusammenfassung

- Die Erfindung betrifft wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen mit hoher Stabilität, die als Puffersubstanzen Succinat und/oder Tartrat enthalten,
- 5 Lyophilisate und Pulver, die aus solchen Zusammensetzungen erhältlich sind, sowie Arzneimittel-Kits, die solche Lyophilisate und Pulver enthalten.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.